

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

PCT

WORLD PATENT ORGANIZATION

International Office

INTERNATIONAL PATENT APPLICATION PUBLISHED IN ACCORDANCE WITH  
THE AGREEMENT ON INTERNATIONAL COOPERATION IN THE AREA OF PATENTS (PCT)

(51) International Patent Classification <sup>7</sup> : A61K 7/48	A1	(11) International Publication No.: <b>WO 00/15188</b>  (43) International Publication Date: March 23 2000 (03/23/2000)
<p>(21) International File No.: PCT/FR99/02178</p> <p>(22) International Application Date: September 13 1999 (09/13/1999)</p> <p>(30) Priority data: 98/11533 September 15, 1998 (09/15/1998) FR</p> <p>(71) Applicant (for all designated states except US); SEDERMA (FR/FR); 29 rue du Chemin Vert, Boite postale 33, F-78610 Le Perray en Yvelines (FR)</p> <p>(72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant (US only): LINTNER, Karl (FR/FR); 15 Avenue du Parc, F-78120 Rambouillet (FR)</p>		<p>(81) Designated states: AE, AL, AN, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, SI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Published</b> <i>With International Search Report.</i> <i>Before the expiration of the period provided for the modification of claims, will be republished if modifications are received.</i></p>
<p>(54) Title: <b>COSMETIC OR DERMOPHARMACEUTICAL USE OF PEPTIDES FOR HEALING, HYDRATING AND IMPROVING SKIN APPEARANCE DURING NATURAL OR INDUCED AGING (HELIODERMIA, POLLUTION)</b></p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns the use of peptides of general sequence X-Thr-Thr-Lys-Y, wherein in particular X=lysine and Y=serine, in cosmetic or dermopharmaceutical compositions. It is moreover advantageous to use said peptides in mutual combination. In order to enhance their activity and their stability, the peptides are chemically modified to increase their lipophilicity, by grafting on the N-terminal amine of X, either a fatty acid chain, or by esterification or amidation of the C-terminal carboxyl group of Y. The peptides can be obtained by synthesis, biotechnology or controlled hydrolysis of plant proteins. The resulting compositions are advantageously used for stimulating healing, hydrating or all skin treatments. They are particularly active against formation or deterioration of wrinkles and against all the consequences of skin ageing, whether natural or induced (helioderma, pollution), as well as for dry skin.</p>		

## **COSMETIC OR DERMOPHARMACEUTICAL USE OF PEPTIDES FOR HEALING, HYDRATING AND IMPROVING SKIN APPEARANCE DURING NATURAL OR INDUCED AGING (HELIODERMIA, POLLUTION)**

Aging, particularly that of the skin, involves significant biochemical disturbances of intimate tissue which are materialized in macroscopic modifications, usually judged to be unsightly, and which have persistently preoccupied both women and men.

The pursuit of a suntan using natural or solar UV or by the artificial UV of *beauty parlors*, is responsible for a process of skin aging well-known to dermatologists by the name *helioderma* (Dr. C. Musy-Preault, Diseases of the Skin, 1994, Albin Michel ed., Paris).

Other components of our current lifestyle, such as the physical and chemical assaults of pollution and the consumption of alcohol and tobacco, promote and exacerbate the aging processes.

Moreover, in the course of private or professional life, the skin, the first defense of the organism with regard to the outside world, is threatened in its integrity by numerous localized attacks such as cuts, burns, and inflammatory reactions. To correct their damage, the organism has developed a number of complex and mutually overlapping reactions: healing.

The cosmetic industry is continually searching for new ingredients capable of countering the effects of aging in general and/or promoting cutaneous healing.

For this, one of the possible approaches consists of promoting tissue restructuring by the neosynthesis of the various constituent elements of the skin. Just like the cement which assures the cohesion of the bricks in a wall and imparts its solidity to it, the different types of collagen and other mucopolysaccharides are the constituent elements of cutaneous tissue.

Promotion of the synthesis and incorporation of these substances is certainly essential, but is not in itself sufficient. The *terrain must be prepared* by giving it a good foundation on which the mechanisms of healing will be able to effectuate lasting repairs. In the situations described above, this foundation is the extracellular matrix, which takes the name basal layer when it is situated at the interface of the epithelium and the connective tissue. The improvement or reconstruction of the extracellular matrix is essential because it is now known that not only does this structure act "*as a framework, stabilizing the physical structure of the tissues,*" but it also "*plays a part ... in the regulation of the behavior of the cells that are in contact with it - influencing their development, migration, proliferation, form and functions*" (Molecular Biology of the Cell, 3<sup>rd</sup> ed., Medecine-Sciences, Flammarion, Paris, page 972).

We were thus especially interested in two of the main constituents of this extracellular matrix: the collagens and the glycosaminoglycans (also known by the name GAGs).

Within the framework of this patent, the effects of aging on the collagens and the glycosaminoglycans can be summarized by:

- The decrease in the synthesis of these substances by the fibroblasts, a decrease due to the conjunction of two causes: on one hand, the rate of renewal of these productive cells decreases with age, and, on the other, the quantity of substances secreted by these cells likewise diminishes.

When it is known that collagen represents about 80% of the cutaneous proteins, it is easy to understand that the slightest decrease in its tissue concentration can have important consequences on the mechanical and physiological properties of the skin.

The glycosaminoglycans are capable of fixing large amounts of water. The drop in their tissue concentration is thus accompanied by cutaneous dehydration.

- The appearance of structural modifications of the neosynthesized substances which lead to the cross-linking of the fibers and thus to their becoming rigid.

For collagen, the variations in the  $\alpha$  chains modify the distribution of its various forms. For example, the proportion of Type III collagen increases in the epidermis when Type IV collagen accumulates in the basal membrane. The appearance of reactions, enzymatic or not (of the Maillard reaction type), is also observed that create linkages, called crossed linkages, either between two collagen fibers or between the collagen itself and molecules of glucose, thus making the networks of collagen fiber rigid.

Aging is expressed in the glycosaminoglycans by the imperfect synthesis of their polysaccharide chains and by a decrease in their sulfation. Even more than with collagen, the free radical forms of oxygen degrade the GAGs irreversibly.

The skin thus loses some of its *substance* due to the decrease in the quantity of its constituents and hardens due to the loss of elasticity of the collagen fibers and due to its dehydration.

All of this contributes to giving old skin its characteristic appearance: dryness, lack of smoothness, thinning, fragility, and wrinkles of varying number and depth.

As for healing, this at least in part involves similar needs since it must reconstruct and thus build up the tissue mass; locally, this involves the increased synthesis of various cutaneous constituents.

Thus, any product capable of inducing one or more processes that increase locally the synthesis of collagens and glycosaminoglycans will permit the effect sought by all those wishing to reduce the cutaneous stigmata of aging as well as by those wishing to improve healing both with regard to time and with regard to the esthetic appearance and quality of the result.

The invention that is the subject of this patent application is based on the fact that we have developed a product that responds to the above criteria and that we have demonstrated its efficacy in vitro and in vivo by sophisticated scientific tests.

It is known that the synthesis of collagen can be stimulated (in vitro), in cell cultures, by the C-terminal fragment of collagen I which is constituted by the peptide Lys-Thr-Thr-Lys-Ser (Katayama, K., et al., Journal of Biological Chemistry, 259, 9941-9944 (1993)).

Moreover, it is possible to increase the synthesis of the cutaneous glycosaminoglycans by means of plant extracts (for example, in the rat: Chithra, P., et al., Journal of Ethnopharmacology, 59, 179-186 (1998)).

Our patent application is based on the discovery that, administered alone or in combination by the topical route in vivo, and thus in an approach relevant to cosmetics, the peptides of general formula  $R_1-X-Thr-Thr-Lys-(AA)_n-Y$  and their salts, with:

- X representing a basic amino acid of D or L form (lysine, arginine, histidine, ornithine, citrulline, sarcosine, statine),
- $(AA)_n$  representing a chain of n amino acids, natural or not, with n varying between 0 and 5,
- $R_1$  being H or a fatty acid chain with 2 to 22 carbons, hydroxylated or not, saturated or not, linear or branched, containing sulfur or not, cyclic or not, or a biotinyl group, or a protective group of the urethane type used in peptide synthesis such as the benzyloxycarbonyl (Z), t-butyloxycarbonyl (tBoc), fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc), allyloxycarbonyl (Alloc) groups,
- $Y = OR_2$  or  $N_2R_2R_3$  with  $R_2$  and/or  $R_3$  being a hydrogen atom H or an aliphatic or aromatic chain of 1 to 22 carbons, hydroxylated or not, saturated or not, linear or branched, containing sulfur or not, cyclic or not,

with the exception of peptides with  $R_1 = H$  and  $X = Lys$  and  $Y = OH$  and with  $n = 0$  or  $(AA)_n = Ser$  when  $n = 1$ ,

are capable of increasing very considerably the concomitant synthesis of collagen and that of the glycosaminoglycans and that this fact permits a synergic effect to be obtained since the result observed is better than that which would have been expected from the addition of each of these effects.

In fact, the newly formed collagen fibers are immediately interlinked into the network of the glycosaminoglycans of the newly synthesized basal layer, thus accelerating the process of cutaneous regeneration as well as the average level of tissue hydration.

The peptides used advantageously from this point of view can be characterized by the fact that  $n = 1$ ,  $R_1$  is a fatty acid chain with 2 to 22 carbons, and  $Y$  is  $OH$  or  $NH_2$ , and more precisely with  $X = lysine$ ,  $(AA)_n = serine$ ,  $R_1 = a$  palmitoyl group and  $Y = OH$ .

The peptides that are the subjects of this patent application can be obtained either by standard chemical synthesis (in heterogeneous or homogeneous phase), or by enzymatic synthesis (Kullman et al., J. Bio. Chem. 255, 8234 (1980)) from the constituent amino acids or their derivatives.

The small size of these peptides makes it possible to carry out their industrial synthesis at an advantageous cost. Their demonstrated high activity permits their commercial use in a large number of financially acceptable cosmetic or dermatopharmaceutical products.

The peptides can also be obtained by fermentation of a strain of bacteria, whether or not modified by genetic engineering, to produce the desired sequences or their different fragments.

Finally, the peptides can be obtained by extraction of proteins of animal or plant origin, preferably of plant origin, capable of containing these sequences within their structure, followed by controlled enzymatic or non-enzymatic hydrolysis, which liberates the peptide fragments in question (of the sequence X-Thr-Thr-Lys-(AA), preferably Lys-Thr-Thr-Lys-Ser), of average size between 300 and 2000 daltons, with the stipulation that the liberated fragments correspond to the above peptide sequence in the plants that are capable of containing these sequences within their structure. Controlled hydrolysis permits the liberation of these peptide fragments.

To implement the invention it is possible, but not necessary, either to extract the proteins involved first and then hydrolyze them, or to effectuate the hydrolysis first on a crude extract and then to purify the peptide fragments. The hydrolysate can also be used without extracting from it the peptide fragments in question,

nevertheless making sure of the halting of the enzymatic hydrolysis reaction in time and to assay the presence of the peptides in question by appropriate analytical means (tracing by radioactivity, immunofluorescence or immunoprecipitation with specific antibodies, etc.).

Other simpler or more complex processes leading to cheaper or purer products can easily be envisaged by one skilled in the art who is knowledgeable about the technique of extraction and purification of proteins and peptides.

As an example to illustrate the invention, some cosmetic formulas that represent but do not limit the invention are cited:

**Example No. 1: Gel**

Carbopol 1342®	0.3
Propylene glycol	2.0
Glycerine	1.0
White petrolatum	1.5
Cyclomethicone	6.0
Cetyl alcohol	0.5
Lubrajel® MS	10
Triethanolamine	0.3
N-Palmitoyl-sarcosine-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser	0.0005
Water, preservatives, perfume	qsp 100 g.

**Example No. 2: Cream**

Volpo S20	2.4
Volpo S2	2.6
Prostearyl 15	8.0
Beeswax	0.5
Abil® ZP 2434	3.0
Propylene glycol	3.0
Carbopol® 941	0.25
Triethanolamine	0.25
N-Palmitoyl-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser	0.005
Water, preservatives, perfume qsp	100 g

The activities described at the beginning of this application are illustrated by the following examples.

**Example No. 3 Increase in the synthesis of collagen: *in vitro***

The method chosen is a variant of that described by Augustin, C., et al. (Skin Pharmacol. 10, 63-70 (1997)) in that we have used explants of human skin instead of human pulmonary fibroblasts in order to make our results directly usable in cosmetology.

These explants, from mammary or abdominal plastic surgery, are incubated for 72 hours in the presence of  $^3\text{H}$ -proline with the peptide N-palmitoyl-sarcosine-Thr-Thr-Lys-Ser, in three final concentrations in the culture medium ( $2 \times 10^{-4}\%$ ,  $4 \times 10^{-4}\%$  and  $8 \times 10^{-4}\%$ ; that is, 2, 4 and 8 ppm). The explants are then washed, the dermis and epidermis of each explant are separated, homogenized and subjected to lysis. The measurement of the incorporation of  $^3\text{H}$ -proline is then carried out in each lysate. The tests are performed in triplicate.

In parallel, *negative* controls are effectuated under the same conditions but in the absence of the peptide. *Positive* controls effectuated by replacing the peptide tested with Vitamin C.

In the presence of 2, 4 or 8 ppm peptide, the incorporation of  $^3\text{H}$ -proline, which expresses the synthesis of collagen, is raised by respectively 30.2 ( $\pm 2$ )%, 54.7 ( $\pm 5$ )% and 90.9 ( $\pm 5$ )% relative to that which is observed in the control experiments (without the peptide).

Under the same conditions, the reference product, ascorbic acid at the concentration of 0.5 mM, increases the synthesis of collagen by 61.4 ( $\pm 5$ )%.

**Example No. 4: Increase in the synthesis of glycosaminoglycans: *in vitro***

The same protocol as that in Example No. 3 is used, except that on one hand the incubation is carried out in the presence of  $^3\text{H}$ -glucosamine in place of the  $^3\text{H}$ -proline and on the other that Vitamin A acid is used as reference product in place of Vitamin C.

In the presence of 2, 4 or 8 ppm of the peptide Lys-Thr-Thr-Lys-Ser-Ala, the incorporation of  $^3\text{H}$ -glucosamine, which expresses the synthesis of GAGs, is increased respectively by 24.5 ( $\pm 3$ )%, 48.8 ( $\pm 3$ )% and 67.9 ( $\pm 5$ )% relative to that which is observed in the control experiments (without the peptide).

Under the same conditions, the reference product, Vitamin A acid at the concentration of 100 nM, increases the synthesis of GAGs by 45.3 ( $\pm 2$ )%.

The results obtained in these two examples clearly demonstrate a concentration-dependant effect of the peptide on the synthesis of the two constituents of the extracellular matrix.

**Example No. 5: Skin firming activity: *in vitro***

Over 24 hours, human fibroblasts from the same cell culture are put in the presence of standard culture medium, supplemented with different concentrations of peptide (2, 4 and 8 ppm). The controls were unsupplemented.

The stimulation of the synthesis of proteins is evaluated by colorimetry (Biuret reaction).

To standardize the results, the quantity of proteins measured is expressed for 1000 cells present in the test.

Relative to the control experiments, in the presence of either 2, 4 and 8 ppm of the peptide N-palmitoyl-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser, the rise in the concentration of proteins is respectively 14.7 ( $\pm 1.0$ )%, 21.0 ( $\pm 2.4$ )% and 44.8 ( $\pm 1.0$ )%.

Thus, this *in vitro* test demonstrates the concentration-dependant stimulation potential of the peptide at the cutaneous level, an effect directly linked to a firming and thickening of skins that are too thin.

**Example No. 6: Anti-wrinkle activity: *in vivo***

This example reports the anti-wrinkle effect obtained *in vivo* on a panel constituted of 15 adult female volunteers aged 35 to 63 years. The anti-wrinkle effect of the cream from Example No. 2, containing N-palmitoyl-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser at the concentration of 0.005% (50 ppm), is compared with that of a placebo cream (same cream but without the active substance). The creams are applied to precisely identified sites located at the corner of the right or left eye, according to a randomized distribution, twice a day for 28 days. The parameter used is the cutaneous relief at the level of the contour of the eye (the wrinkles known as crow's feet). The quantifications of the different relief variables are carried out by video data processing analysis of silicone imprints taken at the surface of the skin according to protocols described by Corcuff et al. (Int. J. Cosm. Sci. 7, 117-126 (1985)) and Corcuff et al. (in Handbook of non-invasive methods and the skin, Serup & Jemec, Eds., CRC Press, 1985, pp. 89-96).

The table below indicates the difference, in percentages, in the average values obtained between T + 28 days and T0 for the average depths of the principal wrinkle (column A) or for all the wrinkles (column B); for the density of the main wrinkles (column C) as well as for the measurement of the roughness (column D).

	A	B	C	D
Placebo	0.2	+0.5	-1.1	+2.7
Peptide	-18.2	-21.1	-36.9	-21.3

The cream containing N-palmitoyl-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser previously described clearly demonstrates a powerful anti-wrinkle effect since a significant difference is observed between the start and finish of the in vivo study, on the total of the four parameters commonly used in this indication.

It is to be noted that under the same experimental conditions, the placebo cream shows no effect if the N-palmitoyl-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser was not incorporated, which demonstrates well that the beneficial effect observed can be attributed only to the peptide that is the subject of this patent.

It is particularly advantageous to use these peptides in combination.

The peptides of this patent can be obtained by chemical synthesis, by the enzymatic route, by fermentation, by extraction of proteins of plant origin, by standard peptide synthesis in homogeneous or heterogeneous phase or by enzymatic synthesis starting from the constituent amino acids.

The peptides of this patent can be obtained by extraction of proteins from plants, followed by hydrolysis, enzymatic or non-enzymatic, so as to generate peptide fragments of average size between 300 and 2000 daltons; part of the liberated fragments must contain the sequence X-Thr-Thr-Lys-(AA)<sub>n</sub>, preferably the sequence Lys-Thr-Thr-Lys-Ser.

The peptides in this patent, alone or in combination, can be used at concentrations varying between 0.1 and 1000 ppm (w/w), preferably between 1 and 100 ppm (w/w) in the finished cosmetic or dermopharmaceutical product.

The peptides of this patent, alone or in combination, can be used in the form of a solution, dispersion, or emulsion, or encapsulated in vectors such as macro-, micro- or nanocapsules, liposomes or chylomicrons, or included in macro-, micro- or nanoparticles, or in microsponges, or adsorbed on to powdered organic polymers, talcs, bentonites and other mineral supports.

The peptides of this patent, alone or in combination, can be used in any galenical form: O/W and W/O emulsions, milks, lotions, gelling and viscosing polymers, surfactants and emulsifiers, pomades, hair lotions, shampoos, soaps, powders, sticks and crayons, sprays, and body oils.

The peptides of this patent, alone or in combination, can be used with any other commonly used ingredient: extraction and/or synthesis lipids, gelling and viscosing polymers, surfactants and emulsifiers, water- or liposoluble active principles, plant extracts, tissue extracts, marine extracts, sun screens, and antioxidants.

The peptides of this patent, alone or in combination, are used in cosmetic applications to promote healing, hydration, and for all care of the skin, particularly against the formation and exacerbation of wrinkles and against all the consequences of natural or accelerated aging of the skin (helioderma, pollution).

The peptides of this patent, alone or in combination, as well as the cosmetic and dermopharmaceutical compositions containing them, are used for the preparation of a medication to promote healing, hydration and for all skin care, particularly against the formation and exacerbation of wrinkles and against all the consequences of the natural or accelerated aging of the skin (helioderma, pollution).



### Claims

1. Peptides of the general formula  $R_1$ -X-Thr-Thr-Lys-(AA)<sub>n</sub>-Y and their salts, with:

- X representing a basic amino acid of D or L form (lysine, arginine, histidine, ornithine, citrulline, sarcosine, statine),
- (AA)<sub>n</sub> representing a chain of n amino acids, natural or not, with n varying between 0 and 5,
- $R_1$  being H or a fatty acid chain of 2 to 22 carbons, hydroxylated or not, saturated or not, linear or branched, containing sulfur or not, cyclic or not, or a biotinyl group, or a protective group of the urethane type used in peptide synthesis such as the benzyloxycarbonyl (Z), tertbutoxycarbonyl (tBoc), fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc), and allyloxycarbonyl (Alloc) groups,
- $Y = OR_2$  or  $N_2R_2R_3$  with  $R_2$  and/or  $R_3$  being a hydrogen atom H or an aliphatic or aromatic chain of 1 to 22 carbons, hydroxylated or not, saturated or not, linear or branched, containing sulfur or not, cyclic or not,

with the exception of the peptides with  $R_1 = H$  and  $X = Lys$  and  $Y = OH$  and with  $n = 0$  or (AA)<sub>n</sub> = Ser when  $n = 1$ .

2. Peptides in accordance with claim 1, characterized by the fact that  $n = 1$ ,  $R_1$  is a fatty acid chain with 2 to 22 carbons and Y is OH or  $NH_2$ .
3. Peptide in accordance with claim 2, characterized by the fact that X is lysine, (AA)<sub>n</sub> is serine,  $R_1$  is the palmitoyl group and Y is the OH group.
4. Use of peptide(s) of the general formula  $R_1$ -X-Thr-Thr-Lys-(AA)<sub>n</sub>-Y and their salts, with: X representing a basic amino acid of D or L form (lysine, arginine, histidine, ornithine, citrulline, sarcosine, statine), (AA)<sub>n</sub> representing a chain of n amino acids, natural or not, with n varying between 0 and 5, and  $R_1 = H$  or a fatty acid chain of 2 to 22 carbons, hydroxylated or not, saturated or not, linear or branched, containing sulfur or not, cyclic or not, or a biotinyl group, or a protective group of the urethane type used in peptide synthesis such as the benzyloxycarbonyl (Z), tertbutoxycarbonyl (tBoc), fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc), and allyloxycarbonyl (Alloc) groups,  $Y = OR_2$  or  $N_2R_2R_3$  with  $R_2$  and/or  $R_3$  being a hydrogen atom H or an aliphatic or aromatic chain of 1 to 22 carbons, hydroxylated or not, saturated or not, linear or branched, containing sulfur or not, cyclic or not, alone or in combination, in cosmetic or dermatopharmaceutical compositions.
5. Cosmetic or dermatopharmaceutical compositions in accordance with claim 4, characterized by the fact that the peptide(s) is(are) obtained by chemical synthesis, by the enzymatic route, by fermentation or by extraction of proteins of plant origin.
6. Cosmetic or dermatopharmaceutical compositions in accordance with claims 4 and 5, characterized by the fact that the peptide(s) is(are) obtained by standard peptide synthesis in homogeneous or heterogeneous phase or by enzymatic synthesis starting from the constituent amino acids or their derivatives.
7. Cosmetic or dermatopharmaceutical compositions in accordance with claims 4 to 6, characterized by the fact that the peptide(s) is(are) obtained by extraction of proteins from plants, followed by enzymatic or non-enzymatic hydrolysis, in such a way as to generate peptide fragments of average size between 300 and 2000 daltons, part of the fragments liberated having to contain the sequence X-Thr-Thr-Lys-(AA)<sub>n</sub>, preferably the sequence Lys-Thr-Thr-Lys-Ser.

8. Cosmetic or dermopharmaceutical compositions in accordance with claims 4 to 7, characterized by the fact that the peptide(s) is(are) used at concentrations varying between 0.1 and 1000 ppm (w/w), preferably between 1 and 100 ppm (w/w) in the finished product.
9. Cosmetic or dermopharmaceutical compositions in accordance with claims 4 to 8, characterized by the fact that the peptide(s) is(are) used in the form of a solution, dispersion, or emulsion, or encapsulated in vectors like macro-, micro- or nanocapsules, liposomes or chylomicrons, or included in macro-, micro- or nanoparticles, or in microsponges, or adsorbed on powdered organic polymers, talcs, bentonites and other mineral supports.
10. Cosmetic or dermopharmaceutical compositions in accordance with claims 4 to 9, characterized by the fact that the peptide(s) is(are) used in any galenical form: O/W and W/O emulsions, milks, lotions, gelling and viscosing polymers, surfactants and emulsifiers, pomades, hair lotions, shampoos, soaps, powders, sticks and crayons, sprays, and body oils.
11. Cosmetic or dermopharmaceutical compositions in accordance with claims 4 to 10, characterized by the fact that the peptide(s) is(are) used with any other commonly used ingredient: extraction and/or synthesis lipids, gelifying and viscosing polymers, surfactants and emulsifiers, water- or liposoluble active principles, plant extracts, tissue extracts, marine extracts, sun screens, and antioxidants.
12. Cosmetic or dermopharmaceutical compositions in accordance with claim 4 to 11, used in cosmetic applications to promote healing, hydration, and for all skin care, particularly against the formation and exacerbation of wrinkles as well as against all the consequences of natural or accelerated aging of the skin (helioderma, pollution).
13. Use of peptides in accordance with the general formula  $R_1\text{-X-Thr-Thr-Lys-(AA)}_n\text{-Y}$  and their salts, with: X representing a basic amino acid of D or L form (lysine, arginine, histidine, ornithine, citrulline, sarcosine, statine),  $(AA)_n$  representing a chain of n amino acids, natural or not, with n varying between 0 and 5, and  $R_1 = \text{H}$  or a fatty acid chain of 2 to 22 carbons, hydroxylated or not, saturated or not, linear or branched, containing sulfur or not, cyclic or not, or a biotinyl group, or a protective group of the urethane type used in peptide synthesis such as the benzyloxycarbonyl (Z), tertbutoxycarbonyl (tBoc), fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc), and allyloxycarbonyl (Alloc) groups, and  $\text{Y} = \text{OR}_2$  or  $\text{N}_2\text{R}_2\text{R}_3$  with  $\text{R}_2$  and/or  $\text{R}_3$  being a hydrogen atom H or an aliphatic or aromatic chain of 1 to 22 carbons, hydroxylated or not, saturated or not, linear or branched, containing sulfur or not, cyclic or not, alone or in combination; or of cosmetic or dermopharmaceutical compositions in accordance with claim 4 to 12, for the preparation of a medication to promote healing, hydration, and for all skin care, particularly against the formation and exacerbation of wrinkles as well as against all the consequences of natural or accelerated aging of the skin (helioderma, pollution).

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 99/02178

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 A61K7/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	K. KATAYAMA E.A.: "A Pentapeptide from Type I Procollagen Promotes Extracellular Matrix Production" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 14, 1993, pages 9941-9944, XP002106610 cited in the application page 9941 -----	1,4

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 January 2000

Date of mailing of the international search report

31/01/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 600 nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Peeters, J.



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> :</b> <b>A61K 7/48</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 00/15188</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 23 mars 2000 (23.03.00)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR99/02178 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 13 septembre 1999 (13.09.99) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 98/11533 15 septembre 1998 (15.09.98) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> SEDERMA [FR/FR]: 29 rue du Chemin Vert, Boîte postale 33, F-78610 Le Perray en Yvelines (FR). <b>(72) Inventeur; et</b> <b>(75) Inventeur/Déposant (US seulement):</b> LINTNER, Karl [FR/FR]: 15 Avenue du Parc, F-78120 Rambouillet (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.          Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
<b>(54) Title:</b> COSMETIC OR DERMOPHARMACEUTICAL USE OF PEPTIDES FOR HEALING, HYDRATING AND IMPROVING SKIN APPEARANCE DURING NATURAL OR INDUCED AGEING (HELIODERMIA, POLLUTION) <b>(54) Titre:</b> UTILISATION COSMETIQUE OU DERMAPHARMACEUTIQUE DE PEPTIDES POUR LA CICATRISATION, L'HYDRATATION ET L'AMELIORATION DE L'ASPECT CUTANE LORS DU VIEILLISSEMENT NATUREL OU ACCELERE (HELIODERMIE, POLLUTION) <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns the use of peptides of general sequence X-Thr-Thr-Lys-Y, wherein in particular X = lysine and Y = serine, in cosmetic or dermopharmaceutical compositions. It is moreover advantageous to use said peptides in mutual combination. In order to enhance their activity and their stability, the peptides are chemically modified to increase their lipophilicity, by grafting on the N-terminal amine of X, either a fatty acid chain, or by esterification or amidation of the C-terminal carboxyl group of Y. The peptides can be obtained by synthesis, biotechnology or controlled hydrolysis of plant proteins. The resulting compositions are advantageously used for stimulating healing, hydrating or all skin treatments. They are particularly active against formation or deterioration of wrinkles and against all the consequences of skin ageing, whether natural or induced (helioderma, pollution), as well as for dry skin.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>Le brevet décrit l'utilisation de peptides de séquence générale X-Thr-Thr-Lys-Y, avec notamment X = lysine et Y = sérine, dans des compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques. De plus il peut être avantageux d'utiliser ces peptides en combinaison entre eux. Afin de renforcer leur activité et leur stabilité, les peptides sont modifiés chimiquement pour augmenter leur lipophilie, par le greffage sur l'amine N-terminale de X, soit d'une chaîne d'acide gras, soit par l'estérification ou l'amidation du groupe carboxyle C-terminal de Y. Les peptides peuvent être obtenus par synthèse, par biotechnologie ou par hydrolyse ménagée de protéines végétales. Les compositions obtenues sont avantageusement utilisées pour favoriser la cicatrisation, l'hydratation, et pour tous les soins de la peau. Elles agissent particulièrement contre la formation et l'aggravation des rides et contre toutes les conséquences du vieillissement cutané, naturel ou accéléré (hélioderme, pollution), ainsi que dans le dessèchement cutané.</p>		

# UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovenie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Biélorus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

UTILISATION COSMETIQUE OU DERMAPHARMACEUTIQUE DE PEPTIDES POUR LA CICATRISATION,  
L'HYDRATATION ET L'AMELIORATION DE L'ASPECT CUTANE LORS DU VIEILLISSEMENT NATUREL OU  
ACCELERE (HELIODERMIE, POLLUTION)

Le vieillissement, notamment celui de la peau, entraîne d'importantes perturbations  
5 biochimiques tissulaires intimes qui se concrétisent par des modifications  
macroscopiques, habituellement jugées disgracieuses, et qui n'ont cessé de préoccuper  
tant les femmes que les hommes.

La quête du bronzage par les UV naturels, solaires, ou par ceux, artificiels, des *salons*  
*de beauté*, est responsable d'un processus de vieillissement cutané bien connu des  
10 Dermatologues sous le nom d'*héliodermie* (D<sup>r</sup> C. Musy-Preault, (1994) *Les Maladies*  
*de la peau*, Albin Michel ed., Paris).

D'autres composants de notre mode de vie actuel, tels que les agressions physiques et  
chimiques de la pollution; la consommation d'alcool et de tabac, favorisent et  
aggravent les processus de vieillissement.

15 Par ailleurs, au cours de la vie privée ou professionnelle, la peau, premier rempart de  
l'organisme vis-à-vis du monde extérieur, est menacée dans son intégrité par de  
nombreuses agressions ponctuelles comme les coupures, brûlures, réactions  
inflammatoires. Pour en corriger les dégâts, l'organisme a développé une série de  
réactions, complexes et imbriquées entre elles: la cicatrisation.

20 L'industrie cosmétique est en permanence à la recherche de nouveaux ingrédients  
capables de s'opposer aux effets du vieillissement en général et/ou de favoriser la  
cicatrisation cutanée.

Pour cela, une des approches possibles consiste à favoriser la restructuration tissulaire  
par la néo-synthèse des différents éléments constitutifs de la peau. Tout comme le  
25 ciment qui assure la cohésion des briques dans un mur et qui lui confère sa solidité, les  
différents types de collagène et autres mucopolysaccharides, sont les éléments  
constitutifs du tissu cutané.

Favoriser la synthèse et l'incorporation de ces molécules est certes obligatoire mais pas  
suffisant en soi. Il faut également *préparer le terrain* en lui donnant une bonne assise  
30 sur laquelle les mécanismes de la cicatrisation pourront effectuer des réparations  
durables. Dans les situations décrites ci-dessus, cette assise est la matrice  
extracellulaire, qui prend le nom de lame basale lorsqu'elle est située à l'interface de

l'épithélium et du tissu conjonctif. L'amélioration ou la reconstruction de la matrice extracellulaire est primordiale car l'on sait maintenant que non seulement cette structure joue "le rôle de charpente stabilisant la structure physique des tissus" mais qu'également, elle "joue un rôle .... dans la régulation du comportement des cellules qui sont à son contact - influant sur leur développement, leur migration, leur prolifération, leur forme et leurs fonctions (Biologie Moléculaire de la Cellule, 3<sup>ème</sup> éd. Médecine-Sciences, Flammarion, Paris, page 972).

Nous nous sommes donc spécialement intéressés à deux des principaux constituants de cette matrice extracellulaire: les collagènes et les glycosaminoglycanes (également connues sous le nom de GAGs).

Dans le cadre de ce brevet, les effets du vieillissement sur les collagènes et les glycosaminoglycanes peuvent se résumer par:

- La diminution de la synthèse de ces molécules par les fibroblastes, diminution due à la conjonction de deux causes: d'une part le taux de renouvellement de ces cellules productrices diminue avec l'âge et, d'autre part, la quantité de molécules sécrétées par ces cellules diminue également.

Lorsque l'on sait que le collagène représente environ 80% des protéines cutanées, il est facile de comprendre que la moindre diminution de sa concentration tissulaire puisse avoir des conséquences importantes sur les propriétés mécaniques et physiologiques de la peau.

Les glycosaminoglycanes sont capables de fixer de grandes quantité d'eau. La baisse de leur concentration tissulaire entraîne donc une déshydratation cutanée.

- L'apparition de modifications structurales des molécules néo-synthétisées qui conduisent à la réticulation des fibres et donc, à leur rigidification.

Pour le collagène, les variations des chaînes  $\alpha$  modifient la répartition de ses différentes formes. Par exemple, la proportion de collagène de type III augmente dans l'épiderme quand le collagène de type IV s'accumule dans la membrane basale. On constate également l'apparition de réactions, enzymatiques ou non (de type réaction de Maillard), qui créent des liaisons, dites croisées, soit entre deux fibres de collagène, soit entre le collagène lui-même et des molécules de glucose, rigidifiant ainsi les réseaux de fibres de collagène.

Le vieillissement se traduit sur les glycosaminoglycanes par la synthèse imparfaite de leurs chaînes polysaccharides et par une diminution de leur sulfatation. Plus encore que sur le collagène, les formes radicalaires de l'oxygène dégradent les GAGs de manière irréversible.

5 La peau perd donc de sa *substance* par la diminution de la quantité de ses constituants, se durcit par la perte d'élasticité des fibres de collagène et par sa déshydratation.

Tout ceci contribue à donner à la peau âgée ses aspects caractéristiques: sécheresse, absence de souplesse, finesse, fragilité, rides plus ou moins nombreuses et plus ou moins profondes.

10 La cicatrisation quant à elle, fait appel, au moins partiellement, à des besoins semblables puisqu'il lui faut reconstruire, et donc fabriquer de la masse tissulaire; ce qui implique localement, la synthèse accrue des différents constituants cutanés.

Ainsi, tout produit capable d'induire un, ou des, processus augmentant localement la synthèse des collagènes et des glycosaminoglycanes, permettra d'obtenir l'effet  
15 recherché par toutes les personnes voulant réduire les stigmates cutanés du vieillissement ainsi que par celles voulant améliorer la cicatrisation, aussi bien dans le temps que dans l'esthétisme et la qualité du résultat.

L'invention faisant l'objet de cette demande de brevet réside dans le fait que nous avons développé un produit qui répond aux critères précédents et que nous en avons  
20 démontré l'efficacité *in vitro* et *in vivo*, par des tests scientifiques sophistiqués.

Il est connu que la synthèse de collagène peut être stimulée (*in vitro*), dans des cultures cellulaires, par le fragment C-terminal du collagène I que constitue le peptide Lys-Thr-Thr-Lys-Ser (Katayama K. et al., *Journal of Biological Chemistry* (1993),259:9941-9944.

25 Par ailleurs, il est possible d'augmenter la synthèse des glycosaminoglycanes cutanés par des extraits végétaux (par exemple, chez le rat: Chithra P. et al., *Journal of Ethnopharmacology* (1998),59:179-186).

Notre demande de brevet réside dans la découverte, qu'administrés, seuls ou en association entre eux, par voie topique *in vivo*, et donc dans une approche relevant  
30 de la cosmétique, les peptides de formule générale  $R_1\text{-X-Thr-Thr-Lys-(AA)}_n\text{-Y}$  et leurs sels avec:



- X représentant un acide aminé basique de forme D ou L (lysine, arginine, histidine, ornithine, citrulline, sarcosine, statine),
- $(AA)_n$  représentant un enchaînement de n acides aminés naturels ou non, avec n variant de 0 à 5,
- $R_1$  étant H ou une chaîne d'acide gras, de 2 à 22 carbones, hydroxylée ou non, saturée ou non, linéaire ou ramifiée, soufrée ou non, cyclique ou non, ou un groupement biotinyl, ou un groupement protecteur de type uréthane utilisé en synthèse peptidique tel que les groupements benzyloxycarbonyl (Z), tertbutyloxycarbonyl (tBoc), fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc), allyloxycarbonyl (Alloc)
- $Y=OR_2$  ou  $NR_2R_3$  avec  $R_2$  et/ou  $R_3$  étant un atome d'hydrogène H ou une chaîne aliphatique ou aromatique de 1 à 22 carbones, hydroxylée ou non, saturée ou non, linéaire ou ramifiée, soufrée ou non, cyclique ou non, à l'exception des peptides avec  $R_1=H$  et  $X=Lys$  et  $Y=OH$  et avec  $n=0$  ou  $(AA)_n=Ser$  quand  $n=1$ ,

sont capables d'augmenter, de manière très importante, la synthèse concomitante du collagène et celle des glycosaminoglycanes et que ce fait permet d'obtenir un effet de synergie car alors, le résultat observé est supérieur à ce que l'on pouvait espérer de l'addition de chacun de ces effets.

En effet, les fibres de collagène nouvellement formées s'imbriquent immédiatement dans le treillis des glycosaminoglycanes de la lame basale nouvellement synthétisée; accélérant ainsi le processus de régénération cutané ainsi que le niveau moyen d'hydratation tissulaire.

Les peptides utilisés avantageusement dans cette optique peuvent être caractérisés en ce que  $n=1$ ,  $R_1$  est une chaîne d'acide gras de 2 à 22 carbones et Y est OH ou  $NH_2$ , et plus précisément avec  $X = lysine$ ,  $(AA)_n = sérine$ ,  $R_1 = la$  groupement palmitoyl et  $Y = OH$ .

Les peptides, objets de cette demande de brevet, peuvent être obtenus soit par synthèse chimique classique (en phase hétérogène ou en phase homogène), soit par synthèse enzymatique (Kullman et al., J. Biol. Chem. 1980, 255, 8234) à partir des acides aminés constitutifs ou de leurs dérivés.

La petite taille de ces peptides permet d'en faire la synthèse industrielle, à un coût avantageux. Leur grande activité démontrée en autorise l'utilisation commerciale dans un grand nombre de produits cosmétiques ou dermatopharmaceutiques financièrement acceptables.

Les peptides peuvent être obtenus également par fermentation d'une souche de bactéries, modifiées ou non par génie génétique, pour produire les séquences recherchées ou leurs différents fragments.

Enfin, les peptides peuvent être obtenus par extraction de protéines d'origine animale ou végétale, préférentiellement végétale, susceptibles de contenir ces séquences au sein de leur structure, suivie d'une hydrolyse contrôlée, enzymatique ou non, qui libère les fragments peptidiques en question (de séquence X-Thr-Thr-Lys-(AA) préférentiellement Lys-Thr-Thr-Lys-Ser), de taille moyenne comprise entre 300 et 2000 daltons, avec la stipulation que les fragments libérés correspondent à la séquence peptidique précédente dans les plantes qui sont susceptibles de contenir ces séquences au sein de leur structure. L'hydrolyse ménagée permet de dégager ces fragments peptidiques.

Pour réaliser l'invention, il est possible, mais non nécessaire, soit d'extraire les protéines concernées d'abord et de les hydrolyser ensuite, soit d'effectuer l'hydrolyse d'abord sur un extrait brut et de purifier les fragments peptidiques ensuite. On peut également utiliser l'hydrolysât sans en extraire les fragments peptidiques en question, en s'assurant toutefois de l'arrêt de la réaction enzymatique d'hydrolyse à temps et de doser la présence des peptides en question par des moyens analytiques appropriés (traçage par radioactivité, immunofluorescence ou immunoprécipitation avec des anticorps spécifiques, etc.).

D'autres procédés plus simples ou plus complexes, conduisant à des produits moins chers ou plus purs sont facilement envisageables par l'homme de l'art connaissant le métier d'extraction et de purification des protéines et peptides.

A titre d'exemple illustrant l'invention, on cite quelques formules cosmétiques représentatives mais non limitatives de l'invention:

**Exemple n° 1: Gel**

Carbopol 1342 <sup>R</sup>	0,3
Propylène glycol	2,0

	Glycérine	1,0
	Vaseline blanche	1,5
	Cylomethicone	6,0
	Alcool cétylique	0,5
5	Lubrajel <sup>®</sup> MS	10
	triéthanolamine	0,3
	N-Palmitoyl-Sarcosine-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser	0,0005
	Eau, conservateurs, parfum	qsp 100 g.

**Exemple n°2: Crème**

10	Volpo S20	2.4
	Volpo S2	2.6
	Prostéaryl 15	8.0
	Cire d'abeille	0.5
	Abil <sup>®</sup> ZP 2434	3.0
15	Propylène glycol	3.0
	Carbopol <sup>®</sup> 941	0.25
	Triéthanolamine	0.25
	N-Palmitoyl-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser	0,005
	Eau, conservateurs, parfums qsp	100 g

20 Les activités décrites au début de cette demande sont illustrées par les exemples suivants.

**Exemple n° 3: Augmentation de la synthèse de collagène: *in vitro***

25 La méthode choisie est une variante de celle décrite par Augustin C. et al. (*Skin Pharmacol.* (1997);10:63-70) en ce que nous avons utilisé des explants de peau humaine au lieu de fibroblastes pulmonaires humains, ceci afin de rendre nos résultats directement exploitables en cosmétologie.

30 Ces explants, provenant de plastie mammaire ou abdominale, sont incubés, pendant 72 heures en présence de <sup>3</sup>H-proline, avec le peptide, N-Palmitoyl-Sarcosine-Thr-Thr-Lys-Ser, sous trois concentrations finales dans le milieu de culture (2.10<sup>-4</sup> %, 4.10<sup>-4</sup> % et 8.10<sup>-4</sup> %; soit 2, 4 et 8 ppm). Les explants sont alors lavés, le derme et l'épiderme de chaque explant sont séparés, homogénéisés et lysés. La mesure de l'incorporation de <sup>3</sup>H-proline est alors réalisée dans chaque lysat. Les essais sont faits en triplicate.

Parallèlement des contrôles *négatifs* sont réalisés dans les mêmes conditions mais en l'absence du peptide. Des contrôles, *positifs*, quant à eux, sont réalisés en remplaçant le peptide testé par de la vitamine C.

En présence de 2, 4 ou 8 ppm de peptide, l'incorporation de  $^3\text{H}$ -proline qui traduit la synthèse de collagène, est augmentée de respectivement 30,2 ( $\pm 2$ ) %, 54,7 ( $\pm 5$ ) % et 90,9 ( $\pm 5$ ) % par rapport à ce qui est constaté dans les expériences témoin (sans le peptide).

Dans les mêmes conditions, le produit de référence, l'acide ascorbique, à la concentration de 0.5mM, augmente la synthèse du collagène de 61,4 ( $\pm 5$ ) %.

**Exemple n° 4: Augmentation de la synthèse de glycosaminoglycane: *in vitro***

Le même protocole que celui de l'exemple n°3 est utilisé, si ce n'est que, d'une part, l'incubation est réalisée en présence de  $^3\text{H}$ -glucosamine à la place de la  $^3\text{H}$ -proline et que, d'autre part, la vitamine A acide est utilisée comme produit de référence à la place de la vitamine C.

En présence de 2, 4 ou 8 ppm de peptide Lys-Thr-Thr-Lys-Ser-Ala, l'incorporation de  $^3\text{H}$ -glucosamine qui traduit la synthèse de GAGs, est augmentée de respectivement 24,5 ( $\pm 3$ ) %, 48,8 ( $\pm 3$ ) % et 67,9 ( $\pm 5$ ) % par rapport à ce qui est constaté dans les expériences témoin (sans le peptide).

Dans les mêmes conditions, le produit de référence, la vitamine A acide, à la concentration de 100 nM, augmente la synthèse des GAGs de 45,3 ( $\pm 2$ ) %.

Les résultats obtenus dans ces deux exemples démontrent clairement un effet, concentration dépendant, du peptide sur la synthèse des deux constituants de la matrice extracellulaire.

**Exemple n°5: Activité raffermissant cutané: *in vitro***

Durant 24 heures, des fibroblastes humains provenant de la même culture cellulaire, sont mis en présence de milieu de culture standard supplémenté, ou non pour les contrôles, avec différentes concentrations de peptide (2, 4 et 8 ppm).

La stimulation de la synthèse de protéines est évaluée par colorimétrie (réaction dite du Biuret).

Pour standardiser les résultats, la quantité de protéines mesurée est exprimée pour 1000 cellules présentes dans le test.

Par rapport aux expérimentations contrôles, en présence soit de 2, 4 et 8 ppm de peptide N-palmitoyl-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser, l'augmentation de la concentration de protéines est respectivement de 14,7 ( $\pm 1,0$ )%, 21,0 ( $\pm 2,4$ )% et 44,8 ( $\pm 1,0$ )%.

Ainsi, cet essai *in vitro* démontre le potentiel stimulant, concentration dépendant, au niveau cutané du peptide, effet directement lié à un raffermissement et à un épaississement des peaux trop fines.

**Exemple n° 6: Activité antirides: *in vivo***

Cet exemple rapporte l'effet antirides obtenu, *in vivo*, sur un panel constitué de 15 volontaires adultes de sexe féminin, âgées de 35 à 63 ans. Le pouvoir antirides de la crème de l'exemple n°2, contenant le N-Palmitoyl-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser à la concentration de 0,005 % (soit 50 ppm), est comparé à celui d'une crème placebo (même crème mais sans l'actif). Les crèmes sont appliquées sur des sites précisément identifiés, situés sur le coin de l'œil droit ou gauche, selon une répartition randomisée, deux fois par jour, pendant 28 jours. Le paramètre pris en compte est le relief cutané, au niveau du contour de l'œil (rides dites de la *patte d'oie*). Les quantifications des différentes variables du relief sont réalisées par analyse vidéo-informatique d'empreintes au silicone prises à la surface de la peau selon les protocoles décrits par Corcuff et al. (1985, *Int. J. Cosm. Sci.* 7:117-126) et Corcuff et al. (1995, in *Handbook of non-invasive methods and the skin*, Serup & Jemec eds., CRC Press:89-96).

Le tableau ci-dessous indique la différence, en pourcentage, des valeurs moyennes obtenues entre T +28 jours et T0 pour les profondeurs moyennes de la ride principale (colonne A) ou pour l'ensemble des plis (col. B); pour la densité des plis principaux (col. C) ainsi que pour la mesure de la rugosité (col. D).

	A	B	C	D
Placebo	0,2	+ 0,5	- 1,1	+ 2,7
Peptide	- 18,2	- 21,1	- 36,9	- 21,3

La crème contenant le N-Palmitoyl-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser précédemment décrit démontre clairement un puissant effet antirides puisque l'on observe une différence importante entre le début et la fin de l'étude *in vivo* et ceci, sur l'ensemble des quatre paramètres classiquement utilisés dans cette indication.

Il est à noter que, dans les mêmes conditions expérimentales, la crème placebo ne présente aucun effet si le N-Palmitoyl-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser n'y a pas été incorporé, ce

qui démontre bien que c'est seulement au peptide faisant l'objet de ce brevet que l'on peut attribuer l'effet bénéfique observé.

Il est particulièrement avantageux d'utiliser ces peptides en combinaison entre eux.

Les peptides de ce brevet peuvent être obtenus par synthèse chimique, par voie enzymatique, par fermentation, par extraction de protéines d'origine végétale, par synthèse peptidique classique en phase homogène ou hétérogène ou par synthèse enzymatique à partir des acides aminés constitutifs.

Les peptides de ce brevet peuvent être obtenus par extraction de protéines de plantes, suivie d'hydrolyse, enzymatique ou non enzymatique, de façon à générer des fragments peptidiques de taille moyenne comprise entre 300 et 2000 daltons, une partie des fragments libérés devant contenir la séquence X-Thr-Thr-Lys-(AA)<sub>n</sub>, préférentiellement la séquence Lys-Thr-Thr-Lys-Ser.

Les peptides de ce brevet, seuls ou en association entre eux, peuvent être utilisés à des concentrations variant entre 0,1 et 1000 ppm (p/p), préférentiellement entre 1 et 100 ppm (p/p) dans le produit cosmétique ou dermopharmaceutique fini.

Les peptides de ce brevet, seuls ou en association entre eux, peuvent être utilisés sous forme de solution, de dispersion, d'émulsion, ou encapsulé dans des vecteurs comme les macro-, micro- ou nanocapsules, des liposomes ou des chylomicrons, ou inclus dans des macro-, micro- ou nanoparticules, ou dans des microéponges, ou adsorbé sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites et autres supports minéraux.

Les peptides de ce brevet, seuls ou en association entre eux, peuvent être utilisés dans toute forme galénique: émulsions H/E et E/H, laits, lotions, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, pommades, lotions capillaires, shampoings, savons, poudres, sticks et crayons, sprays, huiles corporelles.

Les peptides de ce brevet, seuls ou en association entre eux, peuvent être utilisés avec tout autre ingrédient habituellement utilisé: lipides d'extraction et/ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, principes actifs hydro- ou liposolubles, extraits végétaux, extraits tissulaires, extraits marins, filtres solaires, antioxydants.

Les peptides de ce brevet, seuls ou en association entre eux, sont utilisés dans les applications cosmétiques pour favoriser la cicatrisation, l'hydratation, et pour tous les soins de la peau, particulièrement contre la formation et contre l'aggravation des

rides et contre toutes les conséquences du vieillissement cutané, naturel ou accéléré (héliodermie, pollution).

Les peptides de ce brevet, seuls ou en association entre eux, ainsi que les compositions cosmétiques et dermopharmaceutiques les contenant, sont utilisés  
5 pour la préparation d'un médicament pour favoriser la cicatrisation, l'hydratation, et pour tous les soins de la peau, particulièrement contre la formation et contre l'aggravation des rides et contre toutes les conséquences du vieillissement cutané, naturel ou accéléré (héliodermie, pollution).

### Revendications

1. Peptides de formule générale  $R_1$ -X-Thr-Thr-Lys-(AA)<sub>n</sub>-Y et leurs sels avec:

- X représentant un acide aminé basique de forme D ou L (lysine, arginine, histidine, ornithine, citrulline, sarcosine, statine),
- 5      • (AA)<sub>n</sub> représentant un enchaînement de n acides aminés naturels ou non, avec n variant de 0 à 5,
- $R_1$  étant H ou une chaîne d'acide gras, de 2 à 22 carbones, hydroxylée ou non, saturée ou non, linéaire ou ramifiée, soufrée ou non, cyclique ou non, ou un groupement biotinyl, ou un groupement protecteur de type uréthane utilisé en
- 10      synthèse peptidique tel que les groupements benzyloxycarbonyl (Z), tertbutyloxycarbonyl (tBoc), fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc), allyloxycarbonyl (Alloc)
- $Y=OR_2$  ou  $NR_2R_3$  avec  $R_2$  et/ou  $R_3$  étant un atome d'hydrogène H ou une chaîne aliphatique ou aromatique de 1 à 22 carbones, hydroxylée ou non,
- 15      saturée ou non, linéaire ou ramifiée, soufrée ou non, cyclique ou non,
- à l'exception des peptides avec  $R_1=H$  et  $X=Lys$  et  $Y=OH$  et avec  $n=0$  ou  $(AA)_n=Ser$  quand  $n=1$ .

2. Peptides selon la revendication 1 caractérisés en ce que  $n=1$ ,  $R_1$  est une chaîne d'acide gras de 2 à 22 carbones et Y est OH ou  $NH_2$ .

3. Peptide selon la revendication 2 caractérisé en ce que X est la lysine, (AA)<sub>n</sub> est la sérine,  $R_1$  est le groupement palmitoyl et Y est le groupement OH.

4. Utilisation de peptide(s) selon la formule générale  $R_1$ -X-Thr-Thr-Lys-(AA)<sub>n</sub>-Y et leurs sels avec: X représentant un acide aminé basique de forme D ou L (lysine, arginine, histidine, ornithine, citrulline, sarcosine, statine), (AA)<sub>n</sub> représentant un enchaînement de n acides aminés naturels ou non, avec n variant de 0 à 5 et  $R_1=H$  ou une chaîne d'acide gras, de 2 à 22 carbones, hydroxylée ou non, saturée ou non, linéaire ou ramifiée, soufrée ou non, cyclique ou non, ou un groupement biotinyl, ou un groupement protecteur de type uréthane utilisé en synthèse peptidique tel que les groupements benzyloxycarbonyl (Z), tertbutyloxycarbonyl (tBoc), fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc), allyloxycarbonyl (Alloc) et  $Y=OR_2$  ou  $NR_2R_3$  avec  $R_2$  et/ou  $R_3$  étant un atome d'hydrogène H ou une chaîne aliphatique ou aromatique de 1 à 22 carbones, hydroxylée ou non, saturée ou non, linéaire ou



ramifiée, soufrée ou non, cyclique ou non, seuls ou en association entre eux, dans des compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques.

- 5 5. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon la revendication 4, caractérisées en ce que le ou les peptide(s), est/sont obtenu(s) par synthèse chimique, par voie enzymatique, par fermentation ou par extraction de protéines d'origine végétale.
- 10 6. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon les revendications 4 et 5, caractérisées en ce que le ou les peptide(s) est/sont obtenu(s) par synthèse peptidique classique en phase homogène ou hétérogène ou par synthèse enzymatique à partir des acides aminés constitutifs ou de leurs dérivés.
- 15 7. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon les revendications 4 à 6, caractérisées en ce que le ou les peptide(s) est/sont obtenu(s) par extraction de protéines de plantes, suivie d'hydrolyse, enzymatique ou non enzymatique, de façon à générer des fragments peptidiques de taille moyenne comprise entre 300 et 2000 daltons, une partie des fragments libérés devant contenir la séquence X-Thr-Thr-Lys-(AA)<sub>n</sub>, préférentiellement la séquence Lys-Thr-Thr-Lys-Ser
- 20 8. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon les revendications 4 à 7 caractérisées en ce que le ou les peptide(s) est/sont utilisé(s) à des concentrations variant entre 0,1 et 1000 ppm (p/p), préférentiellement entre 1 et 100 ppm (p/p) dans le produit fini.
- 25 9. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon les revendications 4 à 8 caractérisées en ce que le ou les peptide(s) est/sont utilisé(s) sous forme de solution, de dispersion, d'émulsion, ou encapsulé dans des vecteurs comme les macro-, micro- ou nanocapsules, des liposomes ou des chylomicrons, ou inclus dans des macro-, micro- ou nanoparticules, ou dans des microéponges, ou adsorbé sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites et autres supports minéraux.
- 30 10. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon les revendications 4 à 9, caractérisées en ce que le ou les peptide(s) est/sont utilisé(s) dans toute forme galénique: émulsions H/E et E/H, laits, lotions, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, pommades, lotions capillaires, shampooings, savons, poudres, sticks et crayons, sprays, huiles corporelles.

11. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon les revendications 4 à 10, caractérisées en ce que le ou le(s) peptide(s) est/sont utilisé(s) avec tout autre ingrédient habituellement utilisé: lipides d'extraction et/ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, principes actifs hydro- ou liposolubles, extraits végétaux, extraits tissulaires, extraits marins, filtres solaires, antioxydants.
12. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon les revendications 4 à 11 utilisées dans les applications cosmétiques pour favoriser la cicatrisation, l'hydratation, et pour tous les soins de la peau, particulièrement contre la formation et l'aggravation des rides ainsi que contre toutes les conséquences du vieillissement cutané, naturel ou accéléré (héliodermie, pollution).
13. Utilisation de peptide(s) selon la formule générale  $R_1-X-Thr-Thr-Lys-(AA)_n-Y$  et leurs sels avec: X représentant un acide aminé basique de forme D ou L (lysine, arginine, histidine, ornithine, citrulline, sarcosine, statine),  $(AA)_n$  représentant un enchaînement de n acides aminés naturels ou non, avec n variant de 0 à 5 et  $R_1=H$  ou une chaîne d'acide gras, de 2 à 22 carbones, hydroxylée ou non, saturée ou non, linéaire ou ramifiée, soufrée ou non, cyclique ou non, ou un groupement biotinyl, ou un groupement protecteur de type uréthane utilisé en synthèse peptidique tel que les groupements benzyloxycarbonyl (Z), tertbutyloxycarbonyl (tBoc), fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc), allyloxycarbonyl (Alloc) et  $Y=OR_2$  ou  $NR_2R_3$  avec  $R_2$  et/ou  $R_3$  étant un atome d'hydrogène H ou une chaîne aliphatique ou aromatique de 1 à 22 carbones, hydroxylée ou non, saturée ou non, linéaire ou ramifiée, soufrée ou non, cyclique ou non, seuls ou en association entre eux; ou de compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon les revendications 4 à 12, pour la préparation d'un médicament pour favoriser la cicatrisation, l'hydratation, et pour tous les soins de la peau, particulièrement contre la formation et l'aggravation des rides ainsi que contre toutes les conséquences du vieillissement cutané, naturel ou accéléré (héliodermie, pollution).

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 99/02178

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K7/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	K. KATAYAMA E.A.: "A Pentapeptide from Type I Procollagen Promotes Extracellular Matrix Production" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 14, 1993, pages 9941-9944, XP002106610 cited in the application page 9941 -----	1,4

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier documents but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 January 2000

Date of mailing of the international search report

31/01/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Peeters, J

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 99/02178

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K7/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	K. KATAYAMA E.A.: "A Pentapeptide from Type I Procollagen Promotes Extracellular Matrix Production" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 14, 1993, pages 9941-9944, XP002106610 cité dans la demande page 9941 -----	1,4

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexes

### \* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

24 janvier 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

31/01/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-2016

Fonctionnaire autorisé

Peeters, J